ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۴۵۰-۴۴۷

جهش القایی در ژن کنترل کننده فعالیت هسته یخ با جهش‌زای EMS در دو جدایه از باکتری شبه *Pseudomonas viridiflava*

Induced mutation in gene controlling ice nucleation activity by EMS, in two strains of *Pseudomonas viridiflava* like bacteria

سیده فاطمه رشیدایی*[۱]، حشمت‌اله رحیمیان[۱]، غلامعلی رنجبر[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Rashidaei F[1*], Rahimian H[1], Ranjbar GH[1]

1. MSc Student, Professor, Associate Professor, Mazandaran University, Sari, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Rashidaei.f@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۴- تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

باکتری‌های مولد هسته یخی با افزایش جمعیت و فعالیت خود باعث سرمازدگی گیاهان در دماهای بالاتر از معمول می‌شوند. اساس ژنتیکی هسته‌های یخی باکتریایی به صورت تک ژن کروموزومی *ina* (Ice nucleation active) می‌باشد. برای ایجاد جهش در ژن *ina*، باکتری شبه *Pseudomonas viridiflava* از ماده EMS در دو غلظت ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر استفاده شد. جهت ردیابی ژن *ina* در جدایه‌های شبه *P. viridiflava* از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک جفت آغازگر اختصاصی ژن *ina* که از روی نواحی حفظ شده ژن هسته یخ در چندین گونه باکتری مولد هسته یخی، طراحی شد، استفاده شد. فعالیت هسته یخ با آزمون انجماد قطره‌ای ارزیابی شد. برای بررسی از دست رفتن فعالیت هسته یخی، سوسپانسیون حاوی 10^7 سلول در میلی‌لیتر هر جهش‌یافته بر روی گیاهچه‌های پرتقال پاشیده شده و از گیاهچه تیمار شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. گیاهان به مدت ۷ تا ۱۰ ساعت در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به گلخانه برگردانده شدند. تعدادی از جهش‌یافته‌های به دست آمده در گیاهچه‌ها ایجاد یخ‌زدگی نکردند.

واژه‌های کلیدی

جهش
هسته یخ
EMS
Pseudomonas viridiflav

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.15.5]

پدیده هسته یخ‌زایی اولین بار در سال ۱۹۷۴ در جدایه‌های *Pseudomonas syringae* مشاهده شد. کمی بعد از آن مشخص شد که جدایه‌هایی از *Pseudomonas viridiflava, Pseudomonas fluorescens, Erwinia herbicola (Pantoea agglomerans), Xantomunas translucens* pv. *translucens* توانایی ایجاد یخ در آب سرد شده را دارند (Maki et al. 1974). بیشتر گونه‌های گیاهی می‌توانند تا حدود ۵- درجه سانتی‌گراد بدون یخ زدن، سرد شوند و گونه‌های گیاهی حساس به یخ‌زدگی در غیاب باکتری‌های Ice^+ دچار خسارت ناشی از تشکیل یخ در دمای بالاتر از ۵- درجه سانتی‌گراد نمی‌شوند. Obata et al. (1990) جدایه‌های *Pseudomonas viridiflav* جدا شده از برگ هویج را بر اساس رنگ کلنی‌ها به گروه‌های خاکستری، سفید و یا زرد تقسیم کردند. کلنی‌های سفید و زرد فعالیت هسته یخ از خودشان نشان دادند. آن‌ها یک جدایه از این باکتری‌های مولد هسته یخ را مورد مطالعه قرار دادند و اظهار داشتند که ژن هسته یخ در این باکتری‌ها در دمای ۲/۸- درجه سانتی‌گراد فعال خواهد بود و با استفاده از اوره یا ان- اتیل مالیمید[1] تولید هسته یخ را در باکتری متوقف کردند. Lindow et al. (1995) ثابت کردند که با کاهش اندازه جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت به کمک موتان‌های Ice^- طبیعی و یا حاصل از موتان‌زایی شیمیایی نژادهای *Pseudomonas fluorescens, Pseudomona syringae* و *Erwinia herbicola* صدمات حاصل از سرمازدگی به نحو چشمگیری کاهش می‌یابد. جدایه‌های شبه *Pseudomonas viridiflava* از مجموعه جدایه‌های نگهداری شده در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری دریافت شد. برای اطمینان از شناسایی انجام شده، از آزمون لوپات[2] (Klement et al. (1964؛ Lelliott et al. (1966) استفاده شد.

برای تعیین فعالیت هسته یخ جدایه‌ها از آزمون انجماد قطره‌ای[3] طبق روش Marco and Lindow (1990) استفاده شد. باکتری‌ها روی محیط کشت آگار مغذی حاوی سوکروز[4]، با ۱/۵ درصد گلیسیرین کشت و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در آزمون انجماد قطره‌ای از سوسپانسیون قطرات ۱۰ میکرولیتری جدایه‌ها استفاده شد و بر روی ورق آلومینیومی قایق شکل پوشانده شده با لایه نازکی از پارافین و زایلن که قبلاً در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱۵ دقیقه) در آون استریل شده بود، قرار داده شد. قایق‌ها در سطح حمام اتانل سرد با دمای ۵- تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد شناور شدند. از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. آغازگر از روی نواحی حفظ شده ژن هسته یخ در چندین گونه باکتری مولد هسته یخ، از جمله، *Pseudomonas borealis*، *Pseudomonas syringae (inaV gene)* و *Pseudomonas syringae S203* و چند جدایه دیگر که برخی از ویژگی آن‌ها در جدول۱ خلاصه شده، طراحی شد. همترازی توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی توسط برنامه Clustal W موجود در نرم‌افزار BioEdit Ver. 7.0.9.0 انجام شد. از روی این هم‌ترازی و به صورت دستی آغازگری با عنوان *inaC* و توالی (Forward 5´-GGCAGGACAGYTCVYTGAT-3´ و توالی 3´- Reverse 5´-TTGCTKCGGTCDCCCGCKGTYTG) طراحی شد. سپس جفت آغازگر *inaC* با نرم‌افزار PrimerPremier Ver. 5.0 برای تطابق داشتن با توالی ژن هسته یخ باکتری‌های مذکور ارزیابی شد. از آغازگر *inaC* برای ردیابی ژن *ina* در دو جدایه *Pseudomonas viriiflava* استفاده شد. در دو جدایه ۱۰۱ و ۵۱۰ با آغازگر *inaC* قطعه‌ای به اندازه ۳۷۰ bp تکثیر شد. جدایه‌های ۱۰۱ و ۵۱۰ باکتری *P. viridiflava* در محیط مایع معادل K.B (۳-۲ گرم پروتئوز پپتون، ۲ گرم تریپتون، ۱ تا ۲ گرم K_2HPO_4، ۲ تا ۵ میلی‌لیتر گلیسیرین، ۱-۰/۵ گرم سولفات منیزیم) کشت داده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا باکتری‌ها به مرحله رشد لگاریتمی برسند. پس از ۱۲ تا ۲۴ ساعت، با شروع کدر شدن محلول (مرحله رشد لگاریتمی)، از این سوسپانسیون ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر به یک میلی‌لیتر محیط مایع پایه یا محیط LB (تریپتون= ۱۰ گرم، عصاره مخمر=۵ گرم، NaCl = ۵ گرم، NaOH =۱ میلی لیتر با PH=۷) منتقل شد. پس از ۴ الی ۶ ساعت که کدری محیط نسبتاً مشخص شد، EMS در دو تیمار ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر به هر کدام اضافه شد. بعد از آن نمونه‌های تیمار شده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد درون

[1] N-ethylmaleimide
[2] LOPAT
[3] Droplet freezing method
[4] Nutrient agar + sucrose, NAS

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.15.5]

شیکر با تکان ملایم قرار گرفت. باقی‌مانده EMS سلول شستشو داده شد. رسوب نهایی در یک میلی‌لیتر محیط پایه مجدداً سوسپانسیون و به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. به منظور کاهش جمعیت در هر پتری، برای جداسازی راحت‌تر موتان‌ها، سوسپانسیون با آب مقطر استریل رقیق شد و روی محیط معرف جامد فلورسنس KB کشت داده شد تا پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های موتان یافته به دست آمد (Lindow (1983. دو جدایه ۱۰۱ و ۵۱۰ از باکتری شبه *P. viridiflava* به ترتیب در دمای ۶- و ۵- درجه سانتی‌گراد دارای فعالیت هسته یخ بودند. این آزمون در سه تکرار با نتایج مشابه انجام شد. جدایه‌های ۱۰۱ و ۵۱۰ باکتری شبه *Pseudomonas viridiflava* که دارای فعالیت هسته یخ در مرحله رشد لگاریتمی تحت تیمار EMS در دو دوز ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر قرار داده شدند. برای حذف EMS، سلول‌ها شستشو و سلول‌ها در رقت‌های بسیار پایین، رشد داده شدند. کلنی‌های رشد یافته در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت، برای انتخاب جهش یافته‌های فاقد هسته یخ با آزمون PCR با آغازگر *inaC* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعضی از کلنی‌ها با آغازگر تولید باند کردند که برخی از این باندها مانند باند والدینی و بعضی دیگر متفاوت از باند والدینی بودند. تعدادی از این کلنی‌ها نیز با آغازگر *inaC* نتوانستند باندی تولید کنند که به احتمال قوی نشانگر ایجاد جهش در ژن *ice* این کلنی‌ها بود (شکل۱). سوسپانسیون کدری از کلنی‌های جهش یافته بر روی گیاهچه‌های چند برگی پرتقال رشد یافته در محیط پایه MS، اسپورپاشی شد و سپس گیاهچه‌ها به مدت ۱۰- ۷ ساعت در دمای حدود ۱۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این گیاهچه‌ها برای سازگار شدن به محیط گرم ابتدا به یخچال انتقال داده شده و پس از دو روز به محیط گلخانه منتقل شدند. در این آزمون از گیاهچه‌ای که با جدایه وحشی ۵۱۰ آلوده شده بود، به عنوان شاهد مثبت و از گیاهچه تیمار شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. بعد از یک هفته علائم ناشی از سرمازدگی بر روی بعضی از برگ‌های گیاهچه‌ها ظاهر شد. این علائم شامل آب سوختگی برگ‌ها بود. رنگ برخی از برگ‌ها قهوه‌ای تیره شد که می‌تواند حاکی از بیماری‌زایی باکتری و ایجاد بلایت باشد، اما بعضی دیگر رنگی با تیرگی کمتر قهوه‌ای روشن تا مایل به زرد داشتند که می‌تواند ناشی از سرمازدگی برگ‌ها باشد. در ادامه سرمازدگی تمامی سطح برگ به رنگ قهوه‌ای روشن یا زرد مایل به قهوه‌ای در آمد، گیاهچه‌هایی که تا دو هفته پس از تیمار با باکتری‌ها به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از دو هفته علائم سرمازدگی روی گیاهچه‌های صدمه دیده، شدیدتر شد. گیاهچه‌هایی که با جدایه وحشی تیمار شده بودند بعد از یک هفته علائم سرمازدگی مشهودی را نشان دادند. گیاهچه‌های تیمار شده با آب مقطر استریل، هیچ علائمی را نشان ندادند. Edwards et al. (1990) و Wolber (1992) نشان دادند که توزیع ژن هسته یخ با انتقال افقی بین جنس و گونه‌های باکتریایی صورت می‌پذیرد. بنابراین می‌توان این احتمال را داد که به مرور زمان این ژن میان جنس و گونه‌های باکتریایی دچار تغییرات جزیی شده‌است. بنابراین با طراحی جفت آغازگر (*inaC*) از نواحی محافظت شده این ژن در چند باکتری INA^+ می‌توان ژن هسته یخ را تکثیر کرد. Warren et al. (1986) نواحی محافظت شده ژن *ina* را در دو گونه *P. syringae* و *P. fluorescens* مورد بررسی قرار دادند. بررسی‌ها نشان داد که ژن *inaW* مربوط به *P. fluorescens* با ژن *inaZ* مربوط به *P. syringae* شباهت قابل توجهی داشتند. اگرچه ژن‌های هسته یخ در گونه‌های مختلف، کمی با هم متفاوت هستند اما ساختار کلی آن‌ها به هم شبیه است (Wolber (1992. در بررسی ژن هسته یخ باکتری‌های موتانت در مقایسه با تیمار شاهد والدینی وحشی تعداد زیادی از موتان‌های فنوتیپی باندهای مشابه با تیپ والدینی را تولید کردند. بنابراین در این جدایه‌ها احتمالاً جهش در خارج از محدوده تکثیر شده توسط آغازگرها رخ داده و این بخش از ژنوم دست نخورده و قابل تکثیر باقی مانده است، اما بیان کل ژن و تشکیل پروتئین‌های هسته یخ دچار اختلال شده‌است و یا احتمالا می‌تواند هیچ موتاسیونی در کل ژنوم رخ نداده باشد و نشان ندادن فنوتیپ هسته یخ در آزمون قطره‌ای هسته یخ ناشی از عوامل خطا ساز محیطی بوده باشد (Pourmoayyed (2005. بعضی از این موتانت‌های فنوتیپی باندهایی متفاوت با تیپ والدینی را تولید کردند که احتمالاً جهش باعث شکسته شدن ژن هسته یخ شده که این شکستگی قطعاتی با اندازه متفاوت را تکثیر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.15.5]

کرده است. در بررسی اثر موتانت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی بر روی گیاهچه‌های پرتقال حاصل از کشت بافت دیده شد که بعضی از جهش‌یافته‌ها نتوانستند سرمازدگی در گیاه را تشدید کنند. در صورتی که برخی دیگر با گذشت یک هفته علائم سرمازدگی را نشان دادند و در هفته دوم این علائم در بعضی‌ها شدت گرفته و در سایرین این علائم تغییر چندانی نداشت. بنابراین به نظر می‌رسد که در این موتانت‌ها احتمالاً جهش فقط در نواحی تکثیر شده توسط آغازگرها رخ داده ولی بیان قسمت‌های دیگر ژن هسته یخ و بیان پروتئین‌های هسته یخ دچار اختلال نشده است. یعنی قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگر *inaC*، کل ژن هسته یخ این جدایه‌ها را نمی‌توانست پوشش دهد، شاید قسمتی از ژن هسته یخ تکثیر یافته باشد ولی به خاطر این که با این آغازگر امکان تکثیر نداشت ما پی به وجود آن نبردیم. به همین دلیل وجود ژن هسته یخ در این جدایه‌ها باعث بروز علائم سرمازدگی شد. Gibson et al. (2001) نشان دادند که علائم ناشی از سرمازدگی شامل پیدایش رنگ قهوه‌ای و یا خاکستری می‌باشد. در ابتدا بافت برگی تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد اما وقتی گیاه آسیب شدیدی ببیند، ممکن است ساقه و تنه‌اش نیز آسیب ببینند. در گیاه تیمار شده با باکتری نوع وحشی ۵۱۰ علاوه بر آسیب دیدن برگ‌ها، ساقه نیز مورد صدمه قرار گرفت.

منابع

Edwards AR, Van Den Bussche RA, Wichman HA, Orser CS (1994) Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene evolution. Molecular Biology and Evolution 11:911-920.

Gibson R, Kelly J, Wright G (2001) Dealing with freeze damaged landscape plants. Journal of Agricultural Life Scientist of Arizona University.

Keykhasaber M, Rahimian H, Babaeian Jelodar N, Bolouri Moghaddam M (2007) Production of ice nucleation deficient (Ice$^-$) mutants of the epiphytic strains of *Erwinia herbicola.* Iranian Journal of Biotechnology 5:153-157 (in Farsi).

Klement Z, Farkas GL, Lovrekovich L (1964) Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54:474-477.

Lelliott RA, Billing E, Hayward AC (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *pseudomonads*. Journal of Applied Bacteriology 29:470-89.

Lindow SE (1983) Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice nucleation active bacteria. Plant Disease 67:327-333.

Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien MM, Caldwell DR (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Applied Microbiology 28: 456-460.

Marco M, Lindow SE, Quantification of biological ice nuclei from the *inaZ* reporter gene, the droplet freezing method *in*: Loper JE, Lindow SE (1997) Reporter gene systems useful in evaluating in situ gene expression by soil-and plant-associated bacteria. pp.482-492. *In*: Christon Journal Hurst (ed), Manual of Enviromental Microbiology ASM Press. Washington, DC.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologiae Plantarum 15:473-497.

Obata H, Ttakeuchi S, Tokuyama T (1990) Release of cell-free ice nuclei from *Pseudomonas viridiflava* with a triton X-100/EDTA system and their ice nucleation properties. Journal of Ferment Bioengineering 70:308-312.

Pourmoayyed P (2005) Inactivation of ice nucleation activity in strains epiphytic *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae.* M.S. Thesis. Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (in Farsi).

Rouhrazi K, Rahimian H (2011) Bacterial leaf spot disease of sleepy marshmallow caused positive Levan strains of *Pseudomonas viridiflava.* Journal of Plant Diseases 47:39-55 (in Farsi).

Warren G, Corotto L, Wolber P (1986) Conserved repeates in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas.* Nucleic Acids Research 14:8047-8060.

Wolber PK (1992) Bacterial ice nucleation. Advances Microbial Physiology 34:205-237.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-05-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.15.5]